

Российская академия наук
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Общество физиологов растений России
Научный совет по физиологии растений и фотосинтезу
РАН

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
СОВРЕМЕННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Всероссийская научная конференция с
международным участием и школа для молодых
ученых,
посвященная 125-летию Института физиологии
растений им. К.А. Тимирязева РАН

Москва, 23-27 ноября 2015 г.

Сборник материалов

**Москва
2015**

Сточные воды кролеферм как ростовой стимулятор низших фототрофов *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler

Жондарева Я.Д.¹, Тренкениш Р.П.^{1,2}, Горбунова С.Ю.¹

¹ ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского» РАН, Севастополь, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, Севастополь, Российская Федерация

ВВЕДЕНИЕ

Для производства продуктов питания и медицинских препаратов в качестве объекта все чаще стала использоваться прокариотическая микроводоросль спиролина *Arthrospira platensis* за счет того, что в своем составе она содержит высококачественный полноценный белок, количество которого варьирует в пределах 50-70%. Также в ее биомассе содержится большое количество липидов (4-7%), жирных кислот, в том числе и γ -линолевая кислота, а также витаминов, каротина, хлорофилла, фикоцианина и т.д. [1, 2].

Универсальным методом культивирования всех низших фототрофов является их рост на минеральных питательных средах в контролируемых условиях на свету. Однако такие среды не всегда отвечают требованиям для достижения высокой продуктивности культуры, например, недостаток биогенных элементов может лимитировать рост микроводорослей. Такой лимит можно компенсировать путем перехода на миксотрофный тип питания, внося в среду биогенные элементы органического происхождения.

Известно, что содержание и характер источника энергии, углерода и субстрата в питательной среде для выращивания микроводорослей является одним из основных факторов, определяющих рост культуры и накопление биологически активных веществ. Поэтому органические вещества для потенциального их применения при миксотрофном культивировании должны не только способствовать хорошему росту и синтезу биологически ценных веществ, но и быть относительно недорогими и простыми для стерилизации [3]. Важной способностью водорослей является то, что они могут ассимилировать в качестве ростового субстрата более 90% всего азота и фосфора сточных вод. Частичная либо полная замена дорогостоящих минеральных солей, входящих в состав питательных сред для культивирования растительных клеток, на дополнительно вводимую вытяжку сельскохозяйственных отходов позволяет снизить себестоимость их производства.

Все органические удобрения имеют такие важные компоненты для нормального роста *Arthrospira platensis*, как азот, фосфор и калий [4]. В литературе имеется много сведений по культивированию микроводорослей, в частности и спиролины, на продуктах жизнедеятельности сельскохозяйственных животных. Особое внимание уделяется куриному помету [5]. Однако к числу полных органических удобрений можно отнести и кроличий навоз, несмотря на его достаточно редкое использование (табл. 1).

Органическое удобрение имеет немаловажное значение не только как источник органического углерода, но и уголекислоты, которая образуется за счет разложения органического вещества микроорганизмами [4].

В работе представлены экспериментальные результаты оценки возможности использования сточных вод кролеферм в качестве ростового стимулятора низших фототрофов *Arthrospira platensis*.

Табл. 1 Средний состав экскрементов кроликов, получающих сбалансированное питание [4]

| КОМПОНЕНТЫ | СОДЕРЖАНИЕ, % |
|-------------------------------|---------------|
| Азот | 0,8 – 2,0 |
| P ₂ O ₅ | 1,0 – 3,7 |
| K ₂ O | 0,2 – 1,3 |
| CaO | 0,9 – 3,4 |
| Минеральные вещества | 14,0 – 18,0 |
| Сухое вещество | 40,0 – 50,0 |
| pH | 7,2 – 9,7 |

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная работа была выполнена на базе отдела Биотехнологии и фиторесурсов ФГБУН ИМБИ РАН. В качестве объекта исследования был выбран штамм альгологически чистой культуры прокариотической микроводоросли *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler.

Водоросли культивировали в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа объёмом 3 литра, размерами 40×20×5 см, с глубиной освещаемого слоя 5 см при круглосуточном освещении.

Эксперимент проводили в 4-х вариантах (далее №1 – контроль, №2, №3 и №4). В контрольном варианте опыта при культивировании спирулины использовали минеральную питательную среду Заррук [6]. В качестве источника биогенных элементов использовали вытяжку из кроличьего навоза (ВКН), содержащую все основные элементы питания для микроводорослей. Для этого кроличий навоз (содержание влаги – 72,5%) разводили водой в соотношении 1:9 и сбраживали в закрытой емкости. Отличие вариантов заключалось в продолжительности сбраживания навоза. Таким образом, вариант №2 соответствует 7-дневному, №3 – 14-дневному, №4 – 21-дневному сбраживанию кроличьего навоза. Для осаждения взвеси и снижения мутности полученный раствор центрифугировали и фильтровали.

Для равномерного распределения питательных веществ между клетками культура непрерывно барботировалась. Температура суспензии поддерживалась в диапазоне 29-32°C. Прирост клеток определяли по изменению оптической плотности суспензии на фотоэлектроколориметре КФК-2 в области длины волны 750 нм (D₇₅₀). Измерения проводили в стеклянных кюветах с длиной рабочей стороны 0,5 см. Погрешность измерения не превышала 1,0%. В качестве контроля использовали супернатант, соответствующий каждому из вариантов эксперимента. Для этого пробы каждого культиватора центрифугировали в течение 15 мин на лабораторной центрифуге ОПН-

3 с максимальным фактором разделения $g=1,870$ при 3000 об/ мин. Переход от единиц оптической плотности (D_{750}) к величине абсолютно сухого веса (АСВ) осуществляли посредством эмпирического коэффициента:

$$ACB = k \cdot D_{750}.$$

$$k = 0,624 \pm 0,049.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроводоросли культивировали непрерывным способом в накопительном режиме (рис. 1).

Во всех вариантах эксперимента рост микроводорослей имел типичную S-образную форму.

Аппроксимированием линейной фазы накопительной кривой роста [7] вычислили основные кинетические характеристики роста культуры для всех вариантов эксперимента (табл.2).

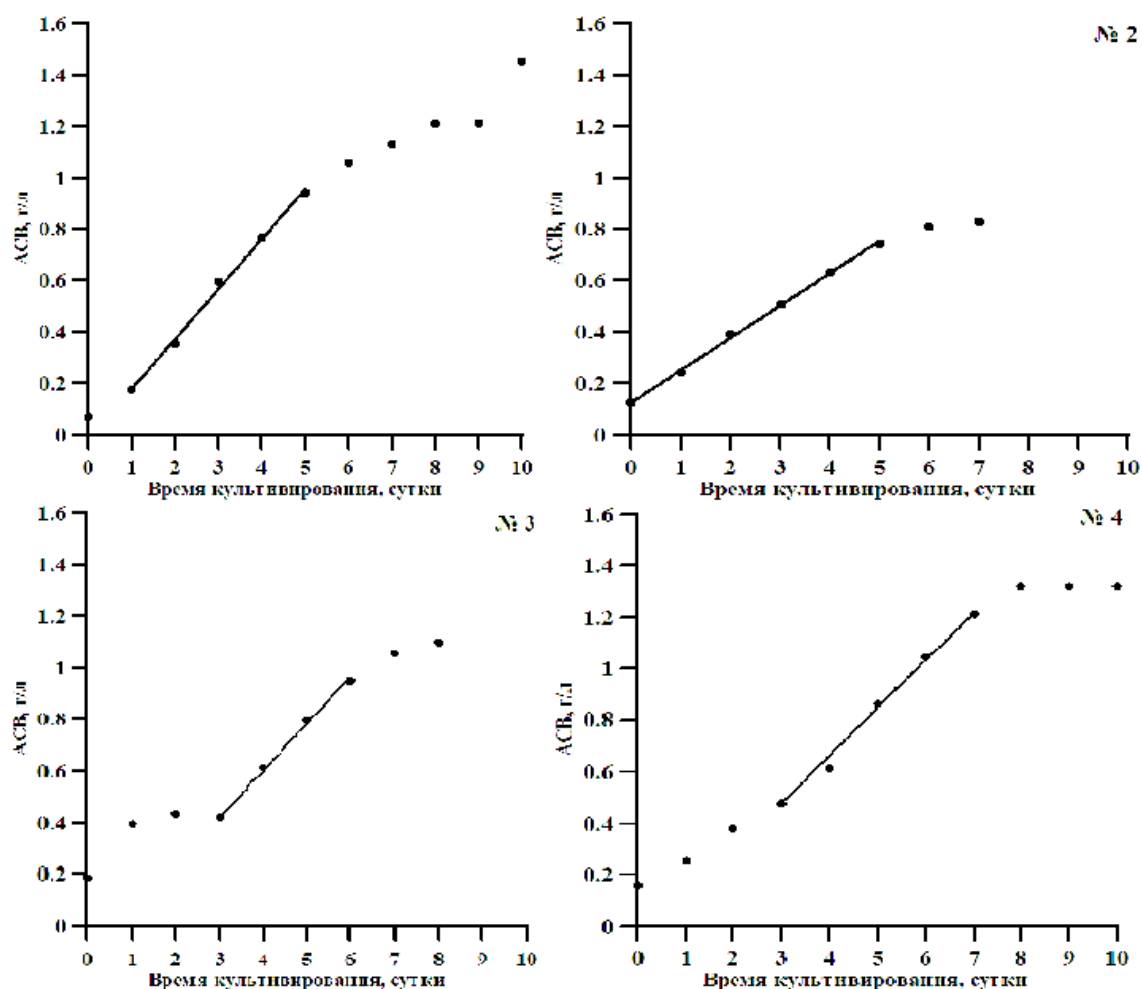


Рис.1 Динамика плотности накопительной культуры *Arthrospira platensis* во всех вариантах эксперимента.

Табл. 2 Параметры роста накопительной культуры *Arthrospira platensis* на органической питательной среде

| Вариант эксперимента | Концентрация ВКН в питательной среде, % | Время сбраживания ВКН, сутки | P_m , г/л•сут | B_m , г АСВ/л |
|----------------------|---|------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 0 | - | 0,195 | 1,45 |
| 2 | 30 | 7 | 0,126 | 0,83 |
| 3 | 30 | 14 | 0,179 | 1,1 |
| 4 | 30 | 21 | 0,185 | 1,32 |

ВКН – вытяжка из кроличьего навоза;

P_m – максимальная продуктивность культуры *A. platensis*, г/л •сут;

B_m – максимальная плотность культуры *A. platensis*, г АСВ/л.

С увеличением времени сбраживания ВКН максимальная продуктивность (P_m) и максимальная биомасса культуры (B_m) *A. platensis* повышаются (рис. 2).

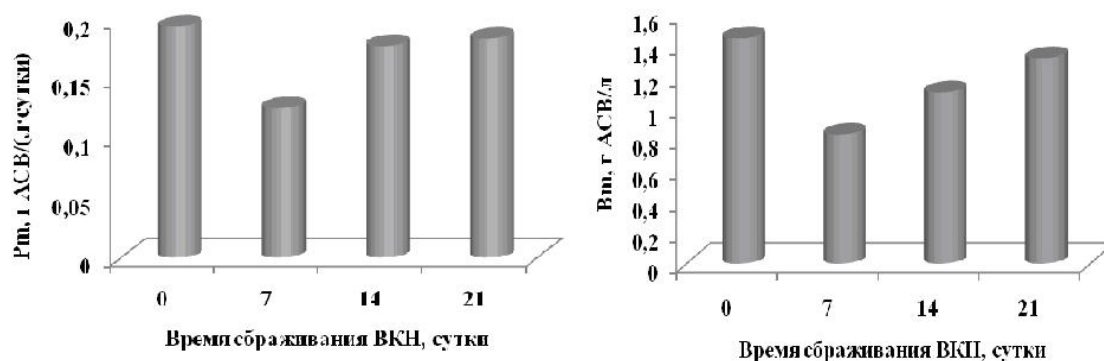


Рис. 2 Зависимость максимальной продуктивности и максимальной биомассы *A. platensis* от времени сбраживания помета

Известно, что свежий кроличий навоз в своем составе имеет достаточно высокое содержание мочевины, что для нормального роста спирулины неприемлемо [4]. Можно предположить, что с увеличением времени сбраживания навоза большая ее часть улетучивается, и создаются оптимальные условия для роста *A. platensis*.

ВЫВОДЫ

В результате обзора литературных источников и собственных экспериментов показано, что органическая вытяжка из кроличьего навоза может служить богатым источником питательных и ростостимулирующих веществ и широко использоваться в практике массового культивирования микроводорослей, что позволит снизить себестоимость биомассы *Arthrospira platensis*.

Экспериментально установлено, что для повышения максимальной продуктивности *A. platensis* необходимо увеличивать время сбраживания кроличьего навоза.

Такой подход к культивированию низших фототрофов может позволить решить немаловажную проблему утилизации отходов кролеферм, а также проблемы экологического, энергетического, агрохимического характера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Borowitzka M.A. Microalgae as source of pharmaceutical and other biologically active compounds // J. Appl. Algal. 1995. V. 7. P. 3–15.
2. Belay A. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management // J. Amer. Nutr. Ass. 2002. 5, N. 2. P. 27–47.
3. Ceron Garcia, M.C., F. Gacia Camacho, A. Sancheth Miron, J.M. Fernandez Sevilla, Y. Chisti, E. Molina Grima. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. J. Microbiol. Biotechnol. 2006. 16(5). P. 689–694.
4. Попов А.В. Применение удобрений на приусадебном участке. Ленинград: Агропромиздат, 1990. 65с.
5. Горбунова С.Ю., Жондарева Я.Д. Использование сточных вод птицефабрик для увеличения продуктивности *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 2015. № 1. С. 70-77.
6. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Seth et Gardner) Geitler: Ph.D These. Paris: A la faculte des sciences de l'universite de Paris, 1966. 114 p.
7. Тренкениш Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура // Экология моря. 2005. Вып. 67. С. 89-97.